Ueber photodynamische Wirkung bei Kombinationen fluoreszierender Stoffe.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. bayr. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anton von Jażdzewski

aus Posen.

München 1913.

Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Ueber photodynamische Wirkung bei Kombinationen fluoreszierender Stoffe.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. bayr. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anton von Jażdzewski

aus Posen.

ACAD. MED. BAT. BIBL.

München 1913.

Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Herr Professor Dr. v. Tappeiner.

Wässerige fluoreszierende Lösungen bekommen im Licht Eigenschaften, welche sie im Dunkeln nicht besitzen. Diese Tatsache wurde zuerst durch v. Tappeiner und O. Raab an Versuchen mit Paramäcien festgestellt; sie beobachteten, dass die Tiere in fluoreszierenden Lösungen — wie Eosin — dem Lichte ausgesetzt in kurzer Zeit starben, während sie im Dunkeln in denselben Lösungen tagelang weiterlebten. v. Tappeiner bezeichnete diese Eigenschaft der fluoreszierenden Stoffe mit dem Namen photodynamische Wirkung. Später wurde durch v. Tappeiner und A. Jodlbauer und ihre Mitarbeiter eine ähnliche schädigende Wirkung auch an anderen Metazoen, an Zellen des tierischen Körpers, an Bakterien, Hefe- und Schimmelpilzen, sowie an verschiedenen Fermenten festgestellt.

Als Fluoreszenz bezeichnet man eine auf Absorption beruhende Lichterscheinung; sie ist nach Aschoffs Definition die Fähigkeit eines Körpers ohne Temperaturerhöhung bei Bestrahlung mit bestimmten Strahlen Lichtstrahlen anderer Qualität aussenden zu können. In der Mehrzahl sind es Lösungen und flüssige Körper, welche diese Eigenschaften besitzen. Doch gibt es auch feste Körper, wie Platincyanür, welche fluoreszieren. In wiefern die Fluoreszenz mit der chemischen Konstitution zusammenhängt, ist bis jetzt nicht genau festgestellt; bei einzelnen aromatischen Körpern wurde der Sitz derselben in der parallelen Doppelbildung in einem Sechsring gesucht. Wiedemann und Schmidt erklären die Fluoreszenz rein physikalisch, indem durch Lichtabsorption hervorgerufene Eigenschwingungen der Moleküle neue Ätherwellen erzeugen, die dann eben als Fluoreszenzlicht ausstrahlen.

Die Wirkung der fluoreszierenden Stoffe wird als eine Erhöhung der Lichtempfindlichkeit aufgefasst und als Sensibilisierungsvorgang bezeichnet, da die Bedingungen für die Wirkung der sichtbaren Strahlen und für die des Systems Licht + fluoreszierende Substanz die gleichen zu sein scheinen (wie z. B. die Sauerstoffanwesenheit). Da die photodynamische Wirkung nur bei Stoffen, die fluoreszieren, vorhanden ist, und da, wie v. Tappeiner und A. Jodlbauer gezeigt haben, mit dem Auftreten der Fluoreszenz die Fähigkeit zu sensibilisieren Hand in Hand geht, muss ein kausaler Zusammenhang zwischen photodynamischer Wirkung fluoreszierender Stoffe und ihrer Fluoreszenz angenommen werden. Das Fluoreszenzlicht selbst ist das wirksame Prinzip nicht. Von grosser Bedeutung für die Stärke der photodynamischen Wirkung ist die Konzentration der fluoreszierenden Stoffe und vor allem die Anwesenheit von Sauerstoff, so dass bei völligem Ausschluss desselben keine Wirkung zu sehen ist. Die Temperatur ist nur von geringem Einfluss.

Es lag nahe, die Wirksamkeit fluoreszierender Lösungen therapeutisch zu verwerten. Die ersten Versuche damit wurden von v. Tappeiner und Jesionek gemacht und zwar dort, wo die therapeutische Wirkung am aussichtsreichsten war, an der Haut. Erfolge waren vor allem beim flachen Hautcarcinom zu verzeichnen, ebenso bei lupösen Erkrankungen. Allerdings war die Wirkung nicht vollständig und nachhaltig genug, so dass in den meisten Fällen bald wieder Rezidive eintraten. Auch künstliche Lichtquellen wurden angewandt, so von Neisser und Halberstetter die Finsenlampe. Es schienen dadurch lupöse Prozesse energischer angegriffen zu werden als bei der Behandlung mit Finsenstrahlen allein. Gute Erfolge wurden von Professor B. Hofer-München bei Protozoenerkrankungen an der Haut der Fische erzielt.

Parasiten im Blut können nur wenig beeinflusst werden, da das Plasma (resp. seine Eiweiskörper) die photodynamische Wirkung stark hemmen (Busck).

Bisher wurden die fluoreszierenden Stoffe nur einzeln auf ihre therapeutische Wirkung untersucht. Da nun experimentell zu sehen ist, dass die eine fluoreszierende Lösung auf Zellen, eine andere auf Fermente oder Bakterien ihre grösste Wirkung zeigt, so dürfte eine Kombination derselben, wo es sich um Einwirkung auf Gewebe handelt, therapeutisch von Bedeutung sein. Ausserdem konnte gerade in letzter Zeit in der Pharmakologie gezeigt werden, dass durch Kombination zweier Mittel eventuell Effekte zu erzielen sind, welche über eine Addition der Einzelwirkungen hinausgehen, so dass man dann von einer Potenzierung der beiden Mittel sprechen kann. Als Beispiel dafür dürfte hier das Morphin und Narkotin angeführt sein.

Diese Erwägungen gaben den Anlass zu den von mir angestellten Versuchen, in denen die kombinierte Wirkung einzelner fluoreszierender Stoffe vor allem auf Intervase, daneben auf Paramäcien und rote Blutkörperchen geprüft wurde.

Versuche.

Bei den Versuchen wurde ausgegangen von der Arbeit von Tillmetz (Inaug.-Dissert., München 1903) über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf den Invertierungsprozess, und es wurden vor allem nur die fluoreszierenden Farbstoffe geprüft, welche damals als schädigend auf Invertase gezeigt hatten.

Invertase ist ein Ferment, welches Rohrzucker in ein Molekül rechts drehender d-Glukose und ein Molekül linksdrehender d-Fruktose spaltet. Da nun die Fruktose stärker links dreht als die Glukose, so dreht das entstandene Gemisch — der Invertzucker — nach links. Aus der Beobachtung der mit Invertase versetzten Rohrzuckerlösung am Polarimeter kann man daher einen direkten Schluss ziehen auf die Wirkung des Fermentes.

Für jede Versuchsreihe wurde eine 10%ige Invertaselösung jedesmal frisch bereitet, indem das Präparat in einer Reibschale mit etwas Wasser verrieben, mit dem entsprechenden Quantum destillierten Wassers vermengt und einmal filtriert wurde. Die so erhaltene Lösung ist klar. Sämtliche in der Arbeit beschriebenen Versuche sind bei diffusem Tageslicht gemacht; es wurde darauf geachtet, Belichtungsfehler möglichst auszuschalten und daher wurden bei ungleichmässig bedecktem Himmel keine vergleichenden Versuche angestellt. Die Versuche wurden teils in offenen, dünnwandigen Schälchen von 5 cm Durchmesser und $2^1/_2$ cm Höhe gemacht, teils in Reagenzgläser von gleicher Glasstärke und gleichem Durchmesser. Bei den einzelnen Versuchen ist jedesmal das Genauere darüber angegeben. In diesem Gläser ka je 10 ccm der 10%igen Invertaselösung, die jeweilige Farblösung und nötigenfalls soviel destilliertes Wasser, dass überall das gleiche Quantum Flüssigkeit erhalten wurde. Diese Gemische wurden dann am offenen Fenster belichtet. Von dem so belichteten Ferment wurden je 5 ccm mit 15 ccm 15%iger Rohrzuckerlösung in offenen Reagenzgläsern im Dunkeln bei Zimmertemperatur einige Stunden lang stehen gelassen, worauf in gebräuchlicher Weise die Drehung am Polarimeter abgelesen wurde. Aus fünf Ablesungen wurde jedesmal das arithmetische Mittel notiert. Die Berechnung der Fermentwirkung ergab sich aus der Drehung der Zuckerlösung — 8,40° — und der Drehung dieser Lösung nach ca. 6stündiger Einwirkung der mit oder ohne Substanzzusatz belichteten Invertase. Alle Ergebnisse wurden auf die Invertierungsgrösse der ohne Zusatz belichteten Invertase = 100 berechnet.

Ich gehe zunächst auf die Kombination von Eosin mit Dichloranthracen 2.7 difulsosaurem Natrium ein, die beide im Lichte Invertase schädigen.

I. Eosin-Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium in Konzentrationen mit gleicher Wirkungsstärke.

a) Kombinierte Wirkung auf Invertase.

Am fehlerfreiesten dürften die Bedingungen, unter denen man den Effekt der Kombination zweier Mittel untersuchen will, dann sein, wenn man ihre Konzentrationen so gewählt hat, dass sie in gleichen Zeiten unter gleichen Versuchsanordnungen gleich stark wirken. Daher wurden diese Konzentrationen vorher experimentell gesucht.

Es folgen nun zwei Versuche mit solchen Konzentrationen gleicher Wirkungsstärke.

Versuch I.

Schalenversuch. Belichtung: $2^3/_4$ Stunden (helle Sonne). Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{1000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7, disulfosaures Natrium $^1/_{10000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 1,1 Wasser . .	$1°26' = 1{,}43°$	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	$4°55' = 4{,}92°$	49	51
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$4°34' = 4{,}57°$	55	45
IV. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. .	$6°32' = 6{,}53°$	27	73

Versuch II.

Schalenversuch. Belichtung: 4 Stunden (heiter). Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10000}$ Mol. Dichlorantracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{1000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Ferment-wirkung in %	Ferment-schädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 2,0 Wasser . .	$1°52' = 1{,}87°$	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	$6°41' = 6{,}68°$	27	73
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	$6°12' = 6{,}20°$	34	66
IV. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 0,9 Wasser	$7°36' = 7{,}60°$	9	91
V. 10,0 Fermentl. + 0,2 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,8 Wasser	$6°38' = 6{,}63°$	28	72
VI. 10,0 Fermentl. + 2,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol	$6°37' = 6{,}62°$	28	72

Es zeigt sich aus Versuch I, dass das Eosin in einer Konzentration von $^1/_{10000}$ Mol. ungefähr gleich stark die Invertase schädigt, wie das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium in Konzentrationen von $^1/_{1000}$ Mol. Die Schädigung beträgt für das Eosin 51 %, für das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium 45 %. Die Kombination beider Körper in diesen Konzentrationen schädigt die Invertase um 73 %. Eine Verdoppelung der Konzentration des Eosins resp. Dichloranthracen — disulfosauren Natriums bewirkt eine derartige Steigerung der photodynamischen Wirkung nicht. Man sieht das aus Versuch II: Die Fermentschädigung durch Eosin in einfacher Konzentration betrug hier 73 %, in doppelter 72 %, die durch Dichloranthracen 2.7 — disulfosaures Natrium in einfacher Konzentration 66 %, in doppelter 72 %. Ginge man mit der Verdoppelung der Konzentrationen weiter, so würde man bei Eosin bald auf eine Konzentration stossen, bei welcher eine starke Abschwächung

der photodynamischen Wirkung vorhanden ist. Dieser Punkt liegt nach Versuchen von A. Jodlbauer und v. Tappeiner bei einer Konzentration von $^1/_{2000}$ Mol., die somit als optimole bezeichnet werden kann. Bei Dichloranthracen 2—7 disulfosaurem Natrium ist eine solche Abschwächung der Wirkung selbst in den höchstmöglichen Konzentrationen nicht vorhanden. Hier entspricht die Grösse der photodynamischen Wirkung der Konzentration.

b) Kombinierte Wirkung auf Paramäcien.

Im Anschluss daran möchte ich gleich die Versuche anführen, welche an Paramäcien und an roten Blutkörperchen mit Eosin-Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium gemacht wurden.

Versuchsordnung: Je 2 ccm einer durch Glaswolle filtrierten Kultur von Paramäcium caudatum wurde mit den verdünnten fluoreszierenden Lösungen und so viel destillierten Wassers, dass überall das gleiche Volumen Flüssigkeit erhalten wurde in flache Uhrschälchen gebracht und am offenen Fenster der Einwirkung des diffusen Tageslichtes ausgesetzt. Es wurde dann notiert, wann die Paramäcien völlig unbeweglich wurden. Dieser Zeitpunkt ist bei schwacher Vergrösserung leicht konstatierbar. Auf den Beginn der Auflösung der Paramäcien wurde nicht gewartet, da derselbe wohl nicht so präzis festzustellen ist. Zur Kontrolle wurden dieselben Versuche gleichzeitig im Dunklen ausgeführt.

Versuch III.

Konzentration der Lösungen: Eosin $^1/_{2000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium-Lösung $^1/_{65\,000}$ Mol. Somit Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{8000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $1/_{260\,000}$ Mol.

Belichtung: Helle Sonne.

	Aufhören der Bewegung in Minuten
I. 2,0 Kultur + 1,0 Eosinlösung + 1,0 Wasser	60
II. 2,0 Kultur + 1,0 Dichloranthracen-Lösung + 1,0 Wasser	66
III. 2,0 Kultur + 1,0 Dichloranthracen-Lösung + 1,0 Eosinlösung	40
IV. 2,0 Kultur + 2,0 Eosinlösung	52
V. 2,0 Kultur + 2,0 Dichloranthracen-Lösung .	48

I.—V. Im Dunkeln nach 24 Stunden alle Paramäcien ungeschädigt

Auch hier mussten erst die passenden Konzentrationen gefunden werden. In einem Gemisch einer $^1/_{8000}$ Mol. Lösung von Eosin und einer $^1/_{260000}$ Mol. Lösung von Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium wurden die Paramäcien nach 40 Minuten unbeweglich, während sie in dem gleich konzentrierten Eosin allein nach 60 Minuten, dem Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natrium nach 66 Minuten unbeweglich wurden. Im Dunkeln waren, wie zu erwarten ist, nach 24 Stunden alle Paramäcien ungeschädigt.

c) Kombinierte Wirkung auf rote Blutkörperchen.

Wie gesagt, wurde die Wirkung des Eosins und Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natriums auch auf rote Blutkörperchen geprüft.

Versuchsanordnung: In offenen Reagenzgläsern wurden je 10 ccm einer 1‰igen Aufschwemmung von gewaschenen roten Rinderblutkörperchen in 0,9%iger Kochsalzlösung mit Eosin und Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium in ähnlicher Anordnung wie bei den Versuchen mit Invertase versetzt. Die

Reagenzgläser wurden, ohne geschüttelt zu werden, am offenen Fenster stehen gelassen; der Eintritt der vollständigen Hämolyse zeigt sich scharf, indem die Trübung der Versuchsflüssigkeit vollkommen verschwindet. Dieser Zeitpunkt wurde notiert. Zur Kontrolle wurden dieselben Gemische 24 Stunden lang im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Versuch IV.

Reagenzglasversuch. Beleuchtung: gleichmässig trüb. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10\,000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{30\,000}$ Mol. Kochsalzlösung: 0,9%.

	Eintritt der Hämolyse nach Stunden
I. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,2 Kochsalzlösung . . .	keine Hämolyse
II. 10.0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Kochsalzlösung	3 Stunden 10 Minuten
III. 10.0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{300}$ Mol. + 0,1 Kochsalzlösung	3 Stunden
IV. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{300}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol.	2 Stunden 30 Minuten

I.—IV. Im Dunkeln nach 24 Stunden keine Hämolyse.

Das Ergebnis war das analoge, wie in den Versuchen mit Invertase und Paramäcien. Bei Eosin trat in einer Konzentration von $^1/_{10\,000}$ Mol. nach 3 Stunden 10 Minuten die Hämolyse ein, bei Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium in einer Konzentration von $^1/_{30\,000}$ Mol. nach 3 Stunden, bei der Kombination beider nach 2 Stunden 30 Minuten ein. Also zeigen auch die Hämolyseversuche, dass die Eosin-Dichloranthracen 2.7 disulfosaures

Natrium Wirkungen sich nur bis zu einem gewissen Grade verstärken. Im Dunkeln trat nach 24 Stunden keine Hämolyse ein, ebenso nicht in dem belichteten Reagenzglas ohne Zusatz.

Es hat sich somit erwiesen, dass eine Kombination von Eosin und Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium, wenn die Konzentrationen der Lösungen so gewählt sind, dass jede für sich gleiche photodynamische Wirkung zeigt, auf Invertase, Paramäcen und rote Blutkörperchen stärker wirkt als die Körper allein, selbst, wenn sie in doppelter Konzentration angewendet werden.

Die Erklärung liegt darin, dass durch das Eosin, welches seine Hauptabsorption im Grün nach E (516,6) besitzt, die Wirkung der grünen Strahlen verstärkt wird, während durch das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium, welches violett und ultraviolett absorbiert, die letzteren Strahlen eine Verstärkung erfahren.

II. Eosin und Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium in Konzentrationen mit verschiedener Wirkungsstärke.

Es wurden nun Versuche angestellt, bei denen die Konzentrationen so gewählt waren, dass der eine Körper eine bedeutend stärkere photodynamische Wirkung auf Invertase etc. entfaltete, als der andere. Die Idee, welche diesen Versuchen zu Grunde lag, besteht darin, dass es wohl denkbar wäre, dass eine Verstärkung der Wirkungen dadurch zustande käme, dass der eine fluoreszierende Körper weniger das Versuchsobjekt z. B. Invertase beeinflusst, als vielmehr den zweiten photodynamischen Körper somit eine Sensibilisierung des Sensibilisators vorläge.

Noch unveröffentlichte Versuche von A. Jodlbauer zeigen nämlich, dass die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Stoffe sich auch auf Farbstoffe, die durch sichtbare Strahlen allein nur sehr wenig angegriffen werden, erstreckt.

Die diesbezüglichen Versuche sind:

Versuch V.

Schalenversuch. Belichtung: $6\,^1/_2$ Stunden (bewölkt). Fermentwirkung: $5\,^1/_2$ Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10\,000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{10\,000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 0,2 Wasser . .	2° 25′ = 2,42°	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	7° 39′ = 7,65°	13	87
III. 10,0 Fermentl. + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	3° 48′ = 3,80°	77	23
IV. 10,0 Fermentl. + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. .	7° 38′ = 7,62°	13	87

Versuch VI.

Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{20\,000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{20\,000}$ Mol. Belichtung: helle Sonne.

	Aufhören der Bewegung der Paramäcien nach Minuten
I. 2,0 Kultur + 1,0 Eosinlösung + 1,0 Wasser	80
II. 2,0 Kultur + 1,0 Dichloranthracen-Lösung + 1,0 Wassser	8
III. 2,0 Kultur + 1,0 Dichloranthracen-Lösung + 1,0 Eosinlösung	8

I.—III. Im Dunkeln alle Paramäcien nach 24 Stunden ungeschädigt.

Versuch VII.

Reagenzglasversuch. Belichtung: gleichmässig bewölkt. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10\,000}$ Mol. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{10\,000}$ Mol. Kochsalzlösung 0,9%.

	Hämolyse nach Stunden
I. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,2 Kochsalzlösung	keine Hämolyse
II. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Kochsalzlösung	4
III. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Kochsalzlösung	3
IV. 10,0 Blut 1 : 1000 + 0,1 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ mol.	3

I.—IV. Im Dunkeln nach 24 Stunden keine Hämolyse.

In diesen Konzentrationen, bei denen die Eosinwirkung weit diejenige des Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natriums übertraf, war somit eine Wirkungsverstärkung nicht nachweisbar; es spricht dies dafür, dass obige Annahme einer Sensibilisierung des Sensibilisators unhaltbar ist.

III. Eosin-Methylenblau.

Da die Kombination Eosin-Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium in Konzentrationen, in denen sie gleich stark photodynamisch wirken, eine Addierung der Wirkungen ergab, so war anzunehmen, dass auch die Kombinationen anderer auf Invertase wirksamer fluoreszierender Stoffe bei entsprechender Konzentration sich ebenso verhielten. In dieser Richtung wurde zunächst geprüft Eosin und Methylenblau.

Versuch VIII.

Schalenversuch. Belichtung: 7 Stunden (helle Sonne). Dauer der Fermentwirkung: $6^1/_2$ Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin: $^1/_{10\,000}$ Mol. Methylenblau: $^1/_{10\,000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 0,2 Wasser . .	$1^\circ 27' = 1{,}45^\circ$	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$7^\circ 32' = 7{,}53^\circ$	12	88
III. 10,0 Fermentl. + 0,1 Methylenblau $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$3^\circ 55' = 6{,}92^\circ$	21	79
IV. 10,0 Fermentl. + 0,1 Methylenblau $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. .	$4^\circ 59' + 4{,}98^\circ$	53	47

I.—IV. Vor dem Ablesen am Polarimeter mit Tierkohle entfärbt.
III.—IV. Methylenblau fällt zum Teil aus — auch bei einem analogen Versuch im Dunkeln.

Während hier das Eosin in $^1/_{10\,000}$ Mol. Lösung die Invertase um 80 % geschädigt hatte, das Methylenblau in $^1/_{10\,000}$ Mol. Lösung um 79 %, so ergab sich bei der Kombination beider nur eine Schädigung von 47 %.

Diese Erscheinung ist überraschend. Sie lässt sich entweder so erklären, dass die beiden Farbstoffe gegenseitig auf einander einwirken und hiedurch die jedem einzelnen von ihnen zukommende photodynamische Wirkung abgeschwächt wird, indem z. B. durch das Methylenblau die Oxydation des Eosins zur Leukobase beschleunigt wird resp. umgekehrt.

Es wäre aber auch denkbar, dass durch die Kombination die Lösungsbedingungen der Farbstoffe sich ändern, sie colloider werden und so ihre photodynamische Wirkung abgeschwächt wird.

Dies sind nur Vermutungen, sichere Gründe hiefür fehlen.

IV. Eosin- 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium.

Wenn bei der Kombination zweier Sensibilisatoren (wie z. B. Methylenblau und Eosin) eine Einschränkung ihrer biologischen Wirkungen dadurch einträte, dass sie sich gegenseitig verändern und hiedurch eine Abschwächung der photodynamischen Wirkung eintritt, so müsste dies umso intensiver in Erscheinung treten, wenn nur der eine dieser Sensibilisatoren auf das biologische Versuchsobjekt z. B. Invertase einwirkt.

Ein solcher auf Invertase kaum einwirkender Sensibilisator ist das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium, obwohl es Zellen (Paramäcien) stark photodynamisch beeinflusst.

Weil das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium nur ultraviolettes Licht absorbiert, das bekanntlich durch Glas nicht durchgeht, wurde auch hier in Schalen belichtet.

Versuch IX.

Schalenversuch. Belichtung: 3 Stunden (helle Sonne). Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10000}$ Mol. 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium: $^1/_{1000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 1,1 Wasser . .	$1^0 44' = 1{,}73^0$	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	$6^0 = 6^0$	36	64
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$1^0 53' = 1{,}88^0$	98	2
IV. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. . . .	$2^0 22' = 2{,}37^0$	90	10

Es ergab sich für Eosin in einer Konzentration von $^1/_{10000}$ Mol. eine Fermentschädigung von 64 %, für

das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium in Konzentrationen von $^1/_{1000}$ Mol. eine solche von 2 %, dagegen trat in dem Gemisch beider nur eine Schädigung von 10 % ein.

Nun wurde versucht, eine Erklärung dafür zu finden. Es wurde ein Versuch analog diesem angestellt, nur ging das Licht, bevor es die Lösung 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium-Eosin-Ferment traf, durch ein Schälchen gefüllt mit 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium in gleicher Konzentration wie in der zu belichtenden Fermentlösung. Somit war ein Filter geschaffen aus 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium und Glas.

Versuch X.

Schalenversuch mit Vorlagen von je 15 ccm 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium in einer Konzentration von $^1/_{1000}$ Mol. Belichtung: $5^1/_2$ Stunden (Regen) + 2 Stunden (helle Sonne). Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10000}$ Mol. 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium $^1/_{1000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	$2^0 22' = 2{,}37^0$	72	28
II. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$0^0 16' = 0{,}27^0$	97	3
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. . . .	$1^0 19' = 1{,}32^0$	84	16
Angenommen	0^0	100	0

Der Versuch fiel ganz analog dem vorigen aus: Das Eosin allein schädigte das Ferment um 28 %, das 2.7

antrachinondisulfosaure Kalium um 3 %, beide kombiniert schädigten das Ferment nur um 16 %.

Es kann sich also, da das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium nur ultraviolette, Glas nicht passierende Strahlen absorbiert, nicht darum handeln, dass das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium auf das Eosin sensibilisierend somit oxydierend und seine photodynamische Wirkung abschwächend wirkt.

Ebenso hemmte das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium die Wirkung des Eosins im Reagenzglas.

Anders war es, wenn in die Lösung fortgesetzt Sauerstoff eingeleitet wurde.

Versuch XI.

Reagenzglasversuch: Durchleitung von Sauerstoff, der mit Natronlauge und Wasser gewaschen wird, durch das Gemisch. Belichtung: $3^1/_4$ Stunden (heiter). Fermentwirkung: 6 Stunden, Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Eosin $^1/_{10000}$ Mol. 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium $^1/_{1000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 1,1 Wasser . .	2° 36′ = 2,60°	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. + 1,0 Wasser	7° 6′ = 7,10°	23	77
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ + 0,1 Wasser	4° 22′ = 4,37°	69	31
IV. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Eosin $^1/_{100}$ Mol. . . .	7° 2′ = 7,03°	24	76

In Versuch XI wurde bei gleicher Versuchsanordnung in Reagenzgläsern belichtet und zwar so, dass mit Natronlauge und destilliertem Wasser gewaschener Sauerstoff während der

ganzen Belichtungszeit gleichmässig durch die Flüssigkeit durchperlte. Das Resultat war nun folgendes: Eosin allein schädigt die Invertase um 77 %, 2,7 antrachinondisulfosaures Kalium allein um 31 %, die Kombination beider diesmal 76 %. Es wird also hier die Schwächung der Eosinwirkung durch die Gegenwart von 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium bei reichlicher Sauerstoffzufuhr vollkommen beseitigt.

Die Erklärung für die hemmende Wirkung des 2.7 antrachinondisulfosauren Kaliums auf Eosin dürfte darin liegen, dass bei der Belichtung das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium oxydiert wird, ebenso wie die Invertase. Die Oxydation des 2.7 antrachinondisulfosauren Kaliums aber beansprucht soviel Sauerstoff, dass für die Oxydierung der Invertase nur mehr ein gewisser Bruchteil übrig bleibt und somit das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium die Invertase vor Oxydation und Zerstörung schützt.

Weitere Beweise für diese Anschauung zu erbringen, ist mir aus Gründen mangelnder Zeit nicht möglich gewesen, doch halte ich diese Erklärung für sehr wahrscheinlich.

V. Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium-2.7 antrachinondisulfosaures Kalium.

Nachdem sich die Hemmung der Eosinwirkung auf Invertase durch Gegenwart von 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium ergeben hatte, muss das gleiche auch für Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium gelten, wenn seiner Lösung 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium zugefügt ist.

Versuch XII.

Schalenversuch. Belichtung: 7 Stunden (bewölkt), Fermentwirkung: 7 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{1000}$ Mol. 2.7 antrachinondisulfosaures Kalium $^1/_{1000}$ Mol.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 2,0 Wasser . .	2°8′ = 2,13°	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 1,0 Antrach. 1/100 Mol. + 1,0 Wasser	2°42′ = 2,70°	91	9
III. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr 1/100 Mol. + 1,0 Wasser	7°9′ = 7,15°	20	80
IV. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. 1/100 Mol. + 1,0 Antrach. 1/100 Mol.	5°37, = 5,62°	44	66

Auch hier wurde in offenen Schälchen belichtet. Das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium in einer Konzentration von 1/1000 Mol. schädigte das Ferment um 80%, das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium in einer Konzentration von 1/1000 Mol. um 9%, während die Kombination beider nur eine Fermentschädigung von 66% ergab. Dieser Versuch entspricht also in seinem Ergebnis vollkommen der oben besprochenen Vermutung. Das 2.7 antrachinondisulfosaure Kalium hemmt auch die Wirkung des Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natriums auf Invertase.

VI. Kombination eines fluoreszierenden Körpers mit nicht fluoreszierenden sensibilisierbaren Farbstoffen.

Vorversuche von A. Jodlbauer haben ergeben, dass nicht fluoreszierende und somit auch photodynamisch nicht wirkende Farbstoffe wie z. B. Malachitgrün und Azobordeaux bereits in neutraler Lösung durch Eosin sensibilisierbar sind: und zwar besteht die Lichtwirkung in Oxydation.

Es ist zu vermuten, dass das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium sich wie das Eosin als Sensibilisator für diese Farbstoffe erweist.

Eine Ausschaltung der vom Dichloranthracen 2,7 disulfosaurem Natrium zur Absorption gelangenden Strahlen findet durch den Zusatz obiger beiden Farbstoffe nicht statt, da das Malachitgrün seine Hauptabsorption im Ende von Rot (618,15) hat, das Azobordeaux im Gelb (562,4) und Grün (522,5). Nach den bisher gemachten Annahmen müssen auch die Zusätze dieser nicht fluoreszierenden Farbstoffe zu Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natron seine photodynamische Wirkung auf Invertase abschwächen, da eben ein Teil des in der Lösung befindlichen Sauerstoffs bei der Oxydation dieser Farbstoffe verbraucht wird.

Versuch XIII.

Schalenversuch. Belichtung: $2^1/_2$ Stunden (helle Sonne), Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{1000}$ Mol. Malachitgrün 1 : 20 000.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I. 10,0 Fermentl. + 1,1 Wasser . .	$0°57' = 0{,}95°$	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	$4°15' = 4{,}25°$	55	45
III. 10,0 Fermentl. + 0,1 Malachitgrün 1 : 200 + 1,0 Wasser	$1°9' = 1{,}15°$	97	3
IV. 10,0 Fermentl. + 0,1 Malachitgrün 1 : 200 + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol.	$3°44' = 3{,}73°$	62	38

I.—IV. Vor dem Ablesen am Polarimeter mit Tierkohle entfärbt.

Hier wurde das Ferment durch das Dichloranthracen 2.7 disulfosaure Natrium in einer Konzentration von $^1/_{1000}$ Mol. um 45 % geschädigt, durch seine Kombination mit Malachitgrün in einer Konzentration

von 1 : 20000 um 38 %. Das Malachitgrün übte in einer Konzentration von 1 : 20000 auf den Invertierungsprozess fast gar keinen Einfluss aus.

Versuch XIV.

Schalenversuch. Belichtung: $2^1/_2$ Stunden (helle Sonne), Fermentwirkung: 6 Stunden. Konzentrationen der Sensibilisatoren im Gemisch: Dichloranthracen 2.7 disulfosaures Natrium $^1/_{1000}$ Mol. Azobordeaux: 1 : 20000.

	Abgelesene Drehung	Fermentwirkung in %	Fermentschädigung in %
I 10,0 Fermentl. + 1,1 Wasser . .	0°57′ = 0,95°	100	0
II. 10,0 Fermentl. + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol. + 0,1 Wasser	4°59′ = 0,98°	55	45
III. 10,0 Fermentl. + 0,1 Azobordeaux 1 : 200 + 1,0 Wasser	0°15′ = 4,25°	99	1
IV. 10,0 Fermentl. + 0,1 Azobordeaux 1 : 200 + 1,0 Dichloranthr. $^1/_{100}$ Mol.	3°50′ = 3,83°	61	39

I.—IV. Vor dem Ablesen am Polarimeter mit Tierkohle entfärbt.

Auch das Azobordeaux setzte in einer Konzentration von 1 : 20000 die Wirkung des Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natriums von 45 % auf 39 % herab, während es selbst auf den Invertierungsprozess keinen Einfluss hatte.

Auch hier hat sich also unsere Annahme bestätigt.

Zusammenfassung.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

I.

Eine Kombination von fluoreszierenden Farbstoffen kann zur Steigerung der photodynamischen Wirkung führen, ausgesprochen aber nur dann, wenn die Konzentrationen so gewählt sind, dass die photodynamische Wirkung jedes einzelnen Stoffes annähernd die gleiche ist.

Das ist z. B. für die photodynamische Wirkung auf Invertase der Fall bei Eosin in einer Konzentration $^1/_{10000}$ Mol. und Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium in einer Konzentration von $^1/_{1000}$ Mol.

II.

Wenn aber Konzentrationen gewählt werden, die in ihrer photodynamischen Wirkung weitgehende quantitative Unterschiede aufweisen, dann ist eine solche Wirkungssteigerung nicht zu beobachten.

III.

Bei der Kombination zweier Sensibilisatoren kann aber auch die umgekehrte Wirkung eintreten — nämlich Hemmung.

Das ist möglich, wenn einem stark wirkenden Sensibilisator ein sehr schwach wirkender zugesetzt wird, der annähernd in dem gleichen Spektralabschnitte Licht absorbiert, wie der stark wirkende.

Ferner aber tritt eine solche Hemmung auch dann ein, wenn der eine Sensibilisator auf den anderen einwirkt.

Der Grund dafür kann ein doppelter sein.

a) Einmal wird durch Gegenwart eines oxydierbaren Sensibilisators der in der Lösung vorhandene Sauerstoff vermindert, und es tritt hiedurch ein Mangel des für die

Schädigung des biologischen Objektes nötigen Sauerstoffs ein. Dass dies tatsächlich der Fall sein kann, wird dadurch bewiesen, dass Sauerstoffdurchleitung die Hemmung beseitigt, wie z. B. bei der Kombination von Eosin und 2.7 antrachinondisulfosaurem Kalium.

In derselben Weise wirken hemmend: Zusätze nicht fluoreszierender, aber sensibilisierbarer Farbstoffe zu Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium, so z. B. Malachitgrün und Azobordeaux. Von einer Einschränkung der von Dichloranthracen 2.7 disulfosaurem Natrium zur Absorption gelangenden Strahlen, welche die sensibilisierende Wirkung bedingen, kann hiebei nicht die Rede sein, da ihre Absorption an einer ganz anderen Stelle liegt, als die des Dichloranthracen 2.7 disulfosauren Natriums.

b) Ferner kann durch gegenseitige Beeinflussung der Sensibilisatoren der biologisch schwächer wirkende den biologisch stärker wirkenden in die Leukoverbindung umwandeln, wodurch ebenfalls in der Kombination eine Abnahme der biologischen Wirkung sich ergeben muss. Dies dürfte der Fall sein bei der Kombination von Eosin und Methylenblau, welche in der Kombination weit geringer wirken, als jeder dieser Körper für sich.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Professor v. Tappeiner und Herrn Professor A. Jodlbauer auch an dieser Stelle meinen Dank aussprechen für die vielseitige Unterstützung, die sie mir bei der Durchführung dieser Arbeit zukommen liessen.

Lebenslauf.

Anton von Jażdzewski, geboren zu Posen am 7. April 1887 als Sohn des Rechtsanwaltes Ladislaus von Jażdzewski, bestand seine Reifeprüfung im März 1906 am Kgl. Mariengymnasium daselbst. In den Jahren 1906 bis 1911 studierte er an den Universitäten in Lausanne und Berlin je ein Semester, in Greifswald zwei Semester und in München sieben Semester Medizin. In München bestand er am 27. April 1912 die ärztliche Prüfung. Während des praktischen Jahres arbeitete er an der medizinischen Universitäts-Poliklinik in Rostock, an der Universitäts-Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten in Berlin und am Pharmakologischen Institut in München.